



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

Veröffentlichungsnummer:

0 017 867
A2

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

Anmeldenummer: 80101802.9

Int. Cl.³: **A 61 K 35/16, A 61 K 37/02,**
C 07 G 7/00

Anmeldetag: 03.04.80

Priorität: 12.04.79 DE 2914903

Anmelder: Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V., Bunsenstrasse 10,
D-3400 Göttingen (DE)

Veröffentlichungstag der Anmeldung: 29.10.80
Patentblatt 80/22

Erfinder: Ruhenstroth-Bauer, Gerhard, Prof. Dr.,
Spietzelbergerstrasse 11, D-8032 Gräfelfing (DE)
Erfinder: Goldberg, Michel, Hohenzollernplatz 8,
D-8000 München 40 (DE)

Benannte Vertragsstaaten: CH FR GB IT LI NL SE

Vertreter: Dreiss, Uwe, Dr. jur. Dipl.-Ing. M.Sc.,
Patentanwälte Dreiss & Fuhlendorf Schickstrasse 2,
D-7000 Stuttgart 1 (DE)

Arzneimittel zur Stimulation der Proliferation von Leberzellen und Leberschutz- und Wachstumsfaktor.

Ein Leberwachstumsfaktor wird hergestellt aus dem Blutplasma normaler Tiere. Das Blutplasma wird durch Ansäuerung und Hitzeeinwirkung denaturiert. Es entsteht ein leicht proliferationsaktiver Faktor. Durch Einwirken einer Peptid/Peptidylhydrolase entsteht ein hochaktiver Leberschutz- und Wachstumsfaktor, der ein Peptid mit einem Molekulargewicht von ca. 1200 D ist.

EP 0 017 867 A2

BEZEICHNUNG GEÄNDERT
siehe Titelseite

PATENTANWÄLTE
DREISS & FUHLENDORF
SCHICKSTR. 2, D-7000 STUTTGART 1

- 1 -

Arzneimittel zur Stimulation der Proliferation
von Leberzellen

Die Erfindung betrifft ein Arzneimittel zur Stimu-
5 lation der Proliferation von Leberzellen und einen
Leberschutz- und Wachstumsfaktor.

Es ist bereits bekannt, einen Leberwachstumsfaktor
aus der Leber teilhepathektomierter Ratten zu extra-
10 hieren. Es handelt sich dabei um ein Protein oder
Proteid, das keine für die Aktivität bedeutsame
Neuraminsäure besitzt, mit einem Molekulargewicht
zwischen 30000 und 50000 D. Die Wirkung ist organ-
spezifisch, jedoch nicht spezie-spezifisch (Ruhen-
15 stroth-Bauer, Goldberg, Silz u. Strecker, Hoppe-
Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 359, S. 543-545
(April 1977); vgl. ferner die ältere deutsche Patent-
anmeldung P 28 14 981.7-41 v. 7.4.1978 derselben An-
melderin; siehe ferner als Stand der Technik Deme-
20 trion, A.A. and Levenson, S.M., Annual Meeting of
the American Ass. for the Study of Liver Disease,
Nov. 6-8, 1978, Chicago, J11., p. 959). Es ist auch
Gegenstand der älteren Patentanmeldung, aus dem
Plasma von Tieren mit teilhepathektomierter Leber
25 einen Vorfaktor zu extrahieren, aus dem sich ein

Leberwachstumsfaktor durch Behandlung mit Neuraminidase oder Neuramyltransferase abspalten läßt. Aus dieser letztgenannten Art der Gewinnung des Leberwachstumsfaktors läßt sich folgendes Wirkungsmodell ableiten: Die teilhepatektomierte Leber sendet einen irgendwie gearteten Reiz aus, der auf eine im einzelnen noch nicht bekannte Art und Weise zur Existenz des Vorfaktors im Blutplasma führt, der dann z.B. durch Neuraminidase, die im Blut teilhepatektomierter Tiere vermehrt vorhanden ist, in den eigentlichen Leberwachstumsfaktor umgesetzt wird, der zu Proliferation der Leberzellen führt.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, weitere Leberwachstumsfaktoren zu isolieren.

Diese Aufgabe wird durch die im Kennzeichen des Patentanspruches 1 angegebenen Merkmale gelöst. Die Erfindung betrifft Leberschutz- und Wachstumsfaktor selbst.

Die Leberwachstumsfaktoren werden danach also aus dem Blutplasma nicht teilhepatektomierter Tiere gewonnen. Die Erfindung nützt die neue Erkenntnis, daß es - neben dem oben geschilderten Regelkreis - für das Leberwachstum einen davon unabhängigen zweiten Regelkreis gibt, der durch eine stets, also nicht erst nach Teilhepatektomie, im Blutplasma vorhandene Substanz gebildet wird (Faktor aus dem Plasma von Normaltieren = NP). Durch Einwirkung einer Peptid/Peptidyl-Hydrolase, z.B. Trypsin-Chymotrypsin wird dieser Faktor in einen hochaktiven Leberwachstumsfaktor umgesetzt (Plasma von Normaltieren behandelt mit Trypsin-Chymotrypsin = NPTC). Diesen neuen Leberwachstumsfaktor kann man als Teil eines neuen "zweiten"

Regelkreis bezeichnen, der von dem eingangs erörterten Regelkreis, wie er sich aufgrund der älteren Patentanmeldung P 28 14 981.7-41 ergibt, unabhängig ist (zum Nachweis siehe unten).

5

Man gewinnt also durch Säure-Hitze-Extraktion (NP-Extrakt) des Blutplasmas zunächst einen ersten neuen leichtaktiven Leberwachstumsfaktor. Es handelt sich dabei um eines oder mehrere Proteine. Bereits dieser hat als solcher also eine leicht proliferationsaktivierende Wirkung. Nach einer Behandlung mit Trypsin-Chymotrypsin geben diese Proteine ein oder mehrere Peptide ab, die nun außerordentlich stark proliferationsaktivierend wirken (NPTC-Extrakt).

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem aus teilhepatektomierten Tieren gewonnenen Leberwachstumsfaktor gemäß der älteren Patentanmeldung P 28 14 981.7-41 um ein Protein oder Proteid, das bei einer enzymatischen Behandlung mit Trypsin-Chymotrypsin zerstört wird. Das ist ein erster Nachweis für die Unabhängigkeit dieses neuen Regelkreises von dem oben erwähnten ersten Regelkreis.

25

Daß der NP-Extrakt, der aus Blutplasma durch Ansäuerung und Hitzedenaturierung gewonnen wird, bereits eine gewisse Proliferations-Aktivität aufweist, kann auf eine Eigenschaft der Proteine selbst zurückzuführen sein oder aber darauf, daß schon im NP-Extrakt, möglicherweise an die Proteine gebunden, die im NPTC-Faktor enthaltenen Peptide in gewisser Menge vorhanden sind.

35

Der noch nicht mit Trypsin-Chymotrypsin behandelte NP-Extrakt normaler Tiere weist bereits eine gewisse

- Proliferationsaktivität auf, die über derjenigen der (NaCl-)Kontrollwerte liegt. Die Aktivität des mit Trypsin-Chymotrypsin behandelten NPTC-Extraktes liegt erheblich höher.
- 5 Peptid:Peptidyl-Hydrolasen wie Trypsin-Chymotrypsin spalten typischerweise Peptidverbindungen bzw. -ketten in einzelne Peptide auf. Eine Behandlung dieses hochwirksamen Leberwachstumsfaktors NPTC mit Pronase, einem Enzym, das
- 10 Peptide weiter abbaut, ergibt einen vollkommenen Verlust der Proliferationsaktivität. Daraus ergibt sich, daß der neue Leberwachstumsfaktor ein Peptid ist.
- 15 Daß es sich bei diesem neuen Regelkreis um einen solchen handelt, der von dem bekannten Regelkreis unabhängig ist, ergibt sich neben dem oben erwähnten Nachweis ferner daraus, daß eine Behandlung des neuen Leberwachstumsfaktors mit Neuraminidase oder Beta-Galaktosidase seine Aktivität
- 20 nicht beeinflußt. Es wird also nicht, wie bei dem bereits bekannten "ersten" Leberwachstumsfaktor, sofern er aus Plasma gewonnen wird, durch Behandlung mit Neuraminidase eine Neuraminsäure abgespalten und damit der Rest aktiviert.
- 25
- Da ferner Neuraminsäure meist an Beta-Galaktose gekoppelt ist, die nach Abspaltung der Neuraminsäure von entsprechenden Rezeptoren in der Leber
- 30 aufgenommen wird, müsste ein Faktor auf der Grundlage dieses bekannten Modells inaktiv werden, wenn die Beta-Galaktose durch Beta-Galaktosidase abgespalten wird. Das ist jedoch bei dem neuen Leberwachstumsfaktor nicht der Fall.

Wie im einzelnen weiter unten noch darzustellen sein wird, läßt sich der im NP-Extrakt enthaltene Wirkstoff qualitativ zwar als Protein oder Proteid kennzeichnen; seine wichtigste Charakterisierung ist aber darin zu sehen, daß bei Einwirkung von Trypsin-Chymotrypsin die wesentlich genauer charakterisierbaren Wirkstoffe, die im NPTC-Extrakt enthalten sind, entstehen.

- 5
10 Der neue Leberwachstumsfaktor wird wie folgt gewonnen:

Man entnimmt das Blutplasma normaler Ratten. Die Versuche wurden mit weiblichen 95-105 g schweren SPF-Wistar-Ratten (Institut für Strahlen-Umweltforschung, Neuherberg/München) durchgeführt. Nach der Tötung der Tiere wurden diese entblutet und das Blutplasma wie folgt gewonnen und aufbereitet: Das heparinisierte Vollblut wird 20 min. bei 4000 g zentrifugiert und das Plasma abpipettiert.

Das gewonnene Blutplasma wurde mit einer Salzsäure (HCl-)Lösung in der Konzentration von 0,1 N auf den pH-Wert 5,5 gebracht. Diese Ansäuerung ist ein wichtiges Selektionsmittel zur Abspaltung einer großen Anzahl von Proteinen: Sie werden ausgefällt und damit dem weiteren Konzentrations- bzw. Fällungsprozeß entzogen. Nach Abscheidung der ausgefallten und damit unwirksam gewordenen Substanzen wurde die Restsubstanz bei einer Temperatur von 95°C für die Dauer von 20 Minuten hitzedenaturiert. Damit werden weitere Bestandteile des Plasmas, und zwar solche, die bei dieser Hitze und bei diesem pH-Wert nicht beständig sind, ausgefällt.

- Durch die Ansäuerung auf 5,5 pH und die Hitze-
denaturierung wird ein großer Anteil der Be-
standteile des Plasmas entfernt. Anschließend
erfolgt eine Zentrifugierung für die Dauer von
5 15 Minuten mit 4000 g (Minifuge Christ Osterode/
Harz). Der Überstand enthält somit nur die-
jenigen der insgesamt ursprünglich im Blutplasma
enthaltenen Wirkstoffe, die bei pH = 5,5 und
95°C stabil sind, diese jedoch in konzentrierter
10 Form. Um auch noch diejenigen Teile der Wirkstoffe
zu erfassen, die evtl. in den bei der Zentri-
fugierung enthaltenen Niederschlägen enthalten sind,
wurden die Niederschläge wiederum mit aqua bidest.
auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt, erneut
15 einer Ansäuerung von pH = 5,5 und einer Hitze-
denaturierung bei 95°C unterzogen und zentrifu-
giert. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal
wiederholt. Damit hat man den NP-Extrakt erhalten.
- 20 Die Überstände (NP-Extrakt) dieser insgesamt drei
Zentrifugationsvorgänge wurden zusammengegeben und
der folgenden Trypsin-Chymotrypsin-Behandlung unter-
zogen.
- 25 Von den Überständen werden 150 mg in 20 ml aqua
bidest. gelöst, auf pH 7,6 gebracht und bei 30°C
für zwei Stunden mit jeweils 80 U Trypsin, reinst.
und 90 U α -Chymotrypsin, reinst. (Serva, Heidel-
berg) inkubiert.
- 30 Zur Inaktivierung der restlichen Enzymaktivitäten
wurde dann 30 Minuten bei 95°C inkubiert und zentri-
fugiert. Man erhielt derart den den Leberwachstums-
faktor enthaltenden NPTC-Extrakt.

Danach wurde die Lösung lyophilisiert, in 2 ml einer 0,9% NaCl-Lösung aufgenommen und normalen Ratten intraperitoneal (i.p.) injiziert. Kontrolltieren wurde dieselbe Menge einer 0,9%igen NaCl-Lösung i.p. injiziert.

Die Messung der Proliferation der Leberzellen nach Injektion des NPTC erfolgt durch Messung der DNA-Synthese, indem in die DNA eingebaute radioaktive Substanzen gemessen wurden, nämlich ³H-Methylthymidin (spezielle Aktivität von 25 Ci/mmol; Radiochem. Center, Amersham).

Den Versuchstieren und den Kontrolltieren wurde 19 Stunden nach der Injektion des NPTC 50 μ Ci ³H-Methylthymidin injiziert. Nach einer Stunde wurden die Tiere getötet. Die Leber wurde entfernt und bei -20°C aufbewahrt.

Danach erfolgte eine Extraktion der DNA der Leber nach Weinbren, K. u. Woodward, E. (Br. J. exb. Path. 45,442-449 (1964)). Ein Teil dieses Extraktes wurde zu einer Radioaktivitätsmessung verwendet. Dazu wurden 1,5 ml PCA-(Perchloressigsäure)haltigen Lösung mit 0,5 ml NaOH in der Konzentration 1N neutralisiert. Die entstehende Lösung wurde in einem Scintillationsgläschen mit 5 ml Triton X und 10 ml Toluol (0,6 PPO; PPO = 1,5 - Diphenylloxazol) versetzt.

Mit Hilfe eines Liquid-Scintillationszählers (Inter-technique, Paris) wurde dann die Radioaktivität als Anzahl der Zerfälle pro Minute (Zpm) gemessen. Ein weiterer Teil des DNA-Extraktes wurde zur Messung der DNA-Konzentration nach Burton (Biochem.

J. 62, S. 315-323 (1956)) verwendet. Man erhält auf diese Weise als Maß für die DNA-Synthese die spezifische Aktivität in Zpm/ μ g DNA.

5

Die mit dem NPTC-Extrakt injizierten normalen Ratten zeigten unter den genannten Versuchsbedingungen im Durchschnitt eine mittlere spezifische Aktivität von 372 ± 95 Zpm/ μ g DNA (Anzahl der Versuchstiere: $n = 8$).

10

Die mit dem NP-Extrakt injizierten normalen Ratten zeigten unter denselben Bedingungen im Durchschnitt eine mittlere spezifische Aktivität von 170 ± 36 Zpm/ μ g DNA ($n = 6$).

15

Bei den mit physiologischer Kochsalzlösung injizierten normalen Ratten ergab sich ein Wert von 105 ± 22 Zpm/ μ g DNA ($n = 8$).

20

Der aus dem normalen Blutplasma gewonnene NP-Extrakt ohne Trypsin-Chymotrypsin-Behandlung zeigt bereits eine erhöhte Aktivität. Der NPTC-Extrakt zeigt eine Steigerung um den Faktor 3,5 mit hoher statistischer Sicherheit ($p \ll 0,01$).

25

Dieser Nachweis bedeutet, daß die i.p.-Injektion des NPTC-Extraktes bei normalen Tieren zu einer erheblichen Steigerung der DNA-Synthese führt, die ihrerseits eine notwendige Voraussetzung einer Zellteilung und damit eines Leberwachstums durch Zellteilung ist.

30

Ein weiterer Versuch ergab, daß der NPTC-Extrakt auch in Kulturen von Hepatozyten adulter Ratten

35

proliferationsaktiv ist. Diese Kulturen wurden wie folgt gewonnen:

5 Aus Ratten mit einem Gewicht von 350-450 g wurden
Hepatozyten mit Collagenase nach der Methode von
G. Williams (in vitro, 13, 809 (1977)) isoliert.
Die Zellen wurden mit jeweils 10 ml L-15 Medium
(Boehringer Mannheim) zweimal gewaschen. Danach
10 wurden sie in L-15-Medium aufgeschwemmt, die End-
konzentration betrug $2 - 4 \times 10^5$ Zellen/ml. Je-
weils 1 ml dieser Suspension kam in eine Petri-
schale, dazu wurden je 100 μ l fötales Kälberserum
zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden
(37,5°C, 100% O₂) wurden je Schale 5-7 μ g eines
15 NPTC-Extraktes bzw. bei den Kontrollen physio-
logische NaCl-Lösung hinzugefügt. Nach weiteren
19 Stunden Inkubation wurde für eine Stunde mit
jeweils 0,5 μ Ci ³H-Thymidin markiert. Nach 6-
maligem Waschen mit NaCl-Lösung wurde der Einbau
20 mit eiskalter 7% TCA-Lösung gestoppt, die Zellen
auf Glasfaserfilter abgesaugt und mit TCA und an-
schließend mit Äthanol nachgewaschen. Die Filter
wurden bei 120°C getrocknet und nach oben ge-
schilderter Methode im Liquid-Scintillationszähler
25 gemessen.

Im Vergleich zu Kontrollen zeigte sich bei den
Kulturen, zu denen NPTC zugegeben war, ein um den
Faktor 3-4 vermehrter Einbau von Thymidin im Ver-
30 gleich mit den Kontrollkulturen.

Qualitativ läßt sich der gefundene Leberwachs-
tumsfaktor wie folgt charakterisieren:

Eine Behandlung des NPTC-Extraktes mit Pronase führte zur Inaktivität: Dazu wurde ein NPTC-Extrakt in 10 ml aqua bidest. gelöst, auf pH 7,5 gebracht und bei 37°C für zwei Stunden mit 100 U Pronase P (Sigma, München) inkubiert. Zur Inaktivierung der restlichen Enzymaktivität wurde dann 30 min. bei 95°C inkubiert und zentrifugiert. Danach wurde die Lösung lyophilisiert, in 2 ml 0,9% NaCl-Lösung aufgenommen und normalen Ratten injiziert.

Es ergab sich eine Proliferationsrate von 75 ± 9 Zpm/ μ g DNA. Da einerseits die hohe Aktivität durch eine Trypsin-Chymotrypsin-Behandlung erst hergestellt wird, andererseits durch eine Behandlung mit Pronase zerstört wird, läßt sich daraus der Schluß ziehen, daß es sich um ein Peptid handelt.

Der NPTC-Extrakt wurde ferner mit Neuraminidase und mit Galaktosidase behandelt:

Zur Behandlung mit β -Galaktosidase wurde ein NPTC-Extrakt in 10 ml aqua bidest. gelöst, auf pH 7,3 gebracht und bei 37°C für eine Stunde mit 5 U β -Galaktosidase (Sigma, München) inkubiert. Zur Inaktivierung der restlichen Enzymaktivität wurde dann 30 min. bei 95°C inkubiert und zentrifugiert. Danach wurde die klare Lösung lyophilisiert, in 2 ml 0,9% NaCl-Lösung aufgenommen und normalen Ratten injiziert.

Zur Behandlung mit Neuraminidase wurde ein NPTC-Extrakt in 10 ml aqua bidest. gelöst, auf pH 5,5 gebracht und bei 37°C für eine Stunde mit 250 U

Neuraminidase (Behringwerke AG, Marburg) inkubiert. Zur Inaktivierung der restlichen Enzymaktivität wurde dann 30 min. bei 95°C inkubiert und zentrifugiert. Danach wurde die Lösung lyophilisiert, in
5 2 ml 0,9% NaCl-Lösung aufgenommen und normalen Ratten injiziert.

Sowohl nach der Enzymbehandlung mit β -Galaktosidase als auch nach Neuraminidase-Behandlung änderte sich
10 nicht die hohe Proliferationsaktivität des behandelten NPTC-Extraktes.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde eine G 15-Chromatographie durchgeführt. Als Säulenmaterial
15 wurde Sephadex G 15 verwendet (Säulenvolumen 121 ml). Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 50 mM TRIS-Puffer, pH 7,6, wurde ein NPTC-Extrakt, gelöst in 2 ml desselben Puffers, aufgetragen. Die Flußrate betrug 11 ml/h. Es wurden 5 ml-Fractionen gesammelt
20 und die OD₂₈₀ gemessen. Die einzelnen Proteingipfel wurden gesammelt, lyophilisiert, in 2 ml aqua bidest. aufgenommen und normalen Ratten injiziert. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden folgende Referenzsubstanzen unter denselben Bedingungen auf
25 die Säule aufgetragen: Glutathion (MG 307), NAD (MG 663), 7er Peptid (MG 981). Für den aktiven Proteingipfel ergab sich ein Molekulargewicht von ca. 1200.

30 Mit den beschriebenen Methoden wurde auch ein NPTC-Extrakt aus menschlichem Blutplasma hergestellt. Der derart aus Humanplasma gewonnene NPTC-Extrakt wurde Ratten i.p. injiziert. Nach der Aufarbeitung ergab sich bei den Ratten eine Proliferationsrate
35 von 410 ± 112 Zpm/ μ g DNA (n = 5).

Daraus ist der Schluß zu ziehen, daß der NPTC-Faktor nicht spezies-spezifisch ist. Das läßt dann wiederum mit hoher Wahrscheinlichkeit aufgrund der Versuche mit Ratten den Schluß zu, daß
5 der Faktor auch beim Menschen dieselbe Wirkung hat.

Eine Untersuchung von Milz und Niere der Ratten nach einer Injektion des NPTC-Extraktes ergab
10 Proliferationsraten von 307 ± 66 Zpm/ μ g DNA für Milz (Kontrolle 354 ± 31) und 51 ± 13 Zpm/ μ g DNA für Niere (Kontrolle 43 ± 10) ($n = 4$).

Es ergab sich also keine feststellbare Veränderung.
15 Daraus ist der Schluß zu ziehen, daß der gefundene Leberwachstumsfaktor organspezifisch ist.

Es ist natürlich möglich, den in der beschriebenen Weise gewonnenen Leberwachstumsfaktor NP oder NPTC
20 chemisch zu modifizieren, ohne daß er seine Wirksamkeit verliert, also etwa dadurch, daß an einzelne Gruppen andere angelagert oder daß sie mit anderen ausgetauscht werden. Daher umfaßt die Erfindung auch äquivalente chemische Modifikationen der Fak-
25 toren NP und NPTC.

Für die Herstellung wurde oben u.a. die Ansäuerung auf pH = 5,5 und die Hitzedenaturierung bei ca. 95°C angegeben. Das ist im Sinne einer möglichst
30 effektiven Gewinnung zu verstehen. Es hat sich gezeigt, daß der Faktor auch noch bei 120°C stabil ist, wenngleich die Gewinnung am besten in der dargestellten Weise bei 95°C erfolgt. Auch eine

Hitzedenaturierung bei nur 80°C kann ein bereits in gewissem Umfang brauchbares Ergebnis liefern.

5 Dasselbe gilt für den pH-Wert. Abweichungen (also etwa pH = 5,0 oder 5,3) führen dazu, daß man weniger Substanzen ausfällt; man erhält also einen weniger reinen Extrakt, der jedoch auch schon eine gewisse Wirksamkeit hat. Im Bereich von pH = 5,0 bis 5,5 haben sehr viele Proteine ihren isoelek-
10 trischen Punkt, so daß gerade dieser Bereich für das Ausfällen vieler Proteine günstig ist.

- Ende der Beschreibung -

Patentansprüche:

1. Arzneimittel zur Stimulation der Proliferation von
Leberzellen, dadurch gekennzeichnet, daß es als
5 Wirkstoff einen Neuraminsäure-freien sowie Beta-
Galactose-freien Blutplasmaextrakt mit einem Mole-
kulargewicht von etwa 1200 D enthält, der aus Blut-
plasma durch Ansäuerung auf pH = 5,5, Hitzedena-
turierung bei ca. 95°C, Zentrifugierung und an-
10 schließende Einwirkung einer Peptid/Peptidylhydro-
lase gewonnen wird.
2. Arzneimittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß die Peptid/Peptidylhydrolase Trypsin-Chymo-
15 trypsin ist.
3. Arzneimittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch ge-
kennzeichnet, daß der Wirkstoff einer weiteren, die
Stimulation der Proliferation von Leberzellen nicht
20 beeinträchtigenden chemischen Modifizierung unter-
worfen ist.
4. Leberschutz- und Wachstumsfaktor, dadurch gekenn-
zeichnet, daß er durch einen Neuraminsäure-freien so-
25 wie Beta-Galactose-freien Blutplasmaextrakt mit einem
Molekulargewicht von etwa 1200 D gebildet wird, der
aus Blutplasma durch Ansäuerung auf pH = 5,5, Hitze-
denaturierung bei ca. 95°C, Zentrifugierung und an-
anschließende Einwirkung einer Peptid/Peptidylhydrolase
30 gewonnen wird.

5. Leberwachstumsfaktor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptid/Peptidylhydrolase Trypsin-Chymotrypsin ist.
- 5 6. Leberwachstumsfaktor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß er einer die Stimulation der Proliferation nicht beeinträchtigenden chemischen Modifizierung unterworfen ist.

19



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

11 Veröffentlichungsnummer:

0 017 867
A3

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 80101802.9

51 Int. Cl.³: **A 61 K 35/16, A 61 K 37/02,**
C 07 G 7/00

22 Anmeldetag: 03.04.80

30 Priorität: 12.04.79 DE 2914903

71 Anmelder: **Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., Bunsenstrasse 10, D-3400 Göttingen (DE)**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung: 29.10.80
Patentblatt 80/22

72 Erfinder: **Ruhenstroth-Bauer, Gerhard, Prof. Dr., Spletzelbergerstrasse 11, D-8032 Gräfelfing (DE)**
Erfinder: **Goldberg, Michel, Hohenzollernplatz 8, D-8000 München 40 (DE)**

84 Benannte Vertragsstaaten: **CH FR GB IT LI NL SE**

74 Vertreter: **Dreiss, Uwe, Dr. jur. Dipl.-Ing. M.Sc. et al, Patentanwälte Dreiss, Hosenthien & Fuhlendorf Gerokstrasse 6, D-7000 Stuttgart 1 (DE)**

88 Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 24.02.82 Patentblatt 82/8

54 **Arzneimittel zur Stimulation der Proliferation von Leberzellen und Leberschutz- und Wachstumsfaktor.**

57 Ein Leberwachstumsfaktor wird hergestellt aus dem Blutplasma normaler Tiere. Das Blutplasma wird durch Ansäuerung und Hitzeeinwirkung denaturiert. Es entsteht ein leicht proliferationsaktiver Faktor. Durch Einwirken einer Peptid/Peptidylhydrolase entsteht ein hochaktiver Leberschutz- und Wachstumsfaktor, der ein Peptid mit einem Molekulargewicht von ca. 1200 D ist.

EP 0 017 867 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0017867
Nummer der Anmeldung
EP 80 10 1802

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, Band 79, Nr. 21, 26. November 1973, Seite 99, Nr. 122731r Columbus, Ohio, U.S.A. L. PICKART et al.: "Tripeptide in human serum which prolongs survival of normal liver cells and stimulates growth in neoplastic liver" & NATURE(LONDON), NEW. BIOL. 1973, 243(124), 85-87 * Zusammenfassung *</p> <p>--</p> <p>CHEMICAL ABSTRACTS, Band 71, Nr. 21, 24. November 1969, Seite 134, Nr. 99570m Columbus, Ohio, U.S.A. M. TIMAR et al.: "Efficacy in experimentally induced liver damage of a natural polypeptide" & BIOCHEM. PHARMACOL. 1969, 18(9), 2278-2279 * Zusammenfassung *</p> <p>--</p> <p>HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM., Zeitschrift für Physiologische Chemie, Band 356, März 1975, Seiten 367-376 K.H. SLOTTA et al.: "The cell growth-promoting factor" * Insgesamt *</p> <p>----</p>	<p>1-6</p> <p>1-6</p> <p>1-6</p>	<p>A 61 K 35/16 37/02 C 07 G 7/00</p> <p>RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)</p> <p>A 61 K 35/16 37/02 C 12 N 5/00</p> <p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X: von besonderer Bedeutung A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: kollidierende Anmeldung D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus andern Gründen angeführtes Dokument &: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.</p>			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
Den Haag	27-11-1981	MARIE	